

# 橄榄多酚抗氧化活性研究

张亮亮, 杨志伟, 林益明\*

(厦门大学生命科学学院生物系, 福建厦门 361005)

**摘要:**开发利用天然抗氧化剂是当前食品科技发展的趋势, 橄榄果实中富含各种多酚类物质, 是理想的天然抗氧化剂。本文对橄榄中的多酚含量进行了测定, 用二苯基苦基苯肼自由基 (DPPH·) 和铁离子还原 抗氧化能力测定 (FRAP) 法, 研究了橄榄多酚提取物的自由基清除能力及抗氧化活性。结果表明: 橄榄中多酚含量高达  $572.30 \pm 39.71 \text{ mg/g}$  干重; 橄榄多酚提取物具有较高的自由基清除能力 ( $\text{IC}_{50}$  为  $40.14 \mu\text{g/mL}$ ) 及较强的抗氧化能力 ( $4.27 \text{ mmol/L AAE/g}$ )。

**关键词:** 橄榄, 多酚, 抗氧化, DPPH·, FRAP

## Study on antioxidant activity of polyphenols from *Canarium album* fruits

ZHANG Liang-liang, YANG Zhi-wei, LIN Yi-ming\*

(Department of Biology, School of Life Sciences, Xiamen University, Xiamen 361005, China)

**Abstract:** Exploitation and application natural is trend for development food technology, there are abundant of polyphenols which are the perfect natural antioxidant. Polyphenols content of *Canarium album* (Lour) Rauesch fruits were determined. In addition, the effects of polyphenols from *C. album* fruits on free radical-scavenging and antioxidant activity were determined by using 1, 1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH·) radical scavenging activity and ferric reducing/antioxidant power (FRAP) model systems. The results showed as follows: polyphenols content were  $572.30 \pm 39.71 \text{ mg/g DW}$ ; polyphenols extracted from *C. album* fruits showed a very good DPPH· radical scavenging activity ( $\text{IC}_{50}$  of  $40.14 \mu\text{g/mL}$ ) and ferric reducing/antioxidant power ( $4.27 \text{ mmol/L AAE/g}$ ). The DPPH· radical scavenging activities were well proved with the ferric reducing/antioxidant capacity of the studied polyphenols.

**Key words:** *Canarium album* (Lour) Rauesch; polyphenols; antioxidant; DPPH·; FRAP

中图分类号: TS202.3

文献标识码: A

文章编号: 1002-0306(2008)04-0057-03

抗氧化剂现已广泛地应用于食品工业, 而且需求量逐年增加。食品工业目前主要使用人工合成的抗氧化剂, 近年来人们发现所有经人工合成的抗氧化剂皆有一定的毒性, 如 BHA 对白鼠有致癌作用。而许多植物中的天然抗氧化成分因其安全、健康、无毒而得到人们愈来愈多的关注。因此, 开发利用天然抗氧化剂已成为当今食品科学发展的必然。植物多酚是一类广泛存在于植物体内的多元酚类物质, 主要存在于植物的皮、根、木、叶、果中, 它也是一类具有独特生理活性和药理活性的天然产物。大量研究表明, 植物多酚在抗诱变、抗肿瘤、抗病毒、抗微生物、抗衰老、抗氧化等很多方面具有良好的作用, 在制药、生化、日化、食品以及精细化工等高科技领域具有广阔的应用前景<sup>[1]</sup>。橄榄 (*Canarium album* Lour. Rauesch.) 为橄榄科橄榄属常绿乔木, 主要分布

在福建、广东、广西、台湾等南方省份<sup>[2]</sup>。橄榄果实又名青果, 为我国传统中药材, 具有清热、利咽、祛痰、生津、健脾、解毒等功效<sup>[3]</sup>。橄榄中的没食子酸类多酚为其主要的药效成分, 但目前对橄榄中多酚类化合物的研究尚未见报道。为更好的开发利用橄榄资源, 我们对橄榄果实中多酚类物质抗氧化活性进行了探讨。本实验选用了二苯基苦基苯肼自由基 (DPPH·) 和铁离子还原 抗氧化能力测定 (FRAP) 两种方法, 从清除自由基能力和总抗氧化能力两方面来综合评价橄榄果实中多酚类物质的抗氧化活性, 较为全面地评估了橄榄多酚提取物的抗氧化活性。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料与仪器

新鲜橄榄果实 由福州大世界橄榄有限公司提供, 然后于  $-20^\circ\text{C}$  保存; 实验所用有机溶剂 均为分析纯; 多酚含量测定标准物 本实验室纯化的橄榄果实单宁; 样品纯化所用色谱填料 Sephadex LH-20, Amersham 公司; 二苯基苦基苯肼自由基 (1, 1-diphenyl-2-picrylhydrazyl, DPPH·)、 $\text{Fe}^{3+}$ -三吡啶三吡啶 (tripyrindyl-triazine, TPTZ)、丁基羟基茴香醚

收稿日期: 2007-09-19 \*通讯联系人

作者简介: 张亮亮 (1981-), 男, 博士研究生, 主要从事植物单宁化学研究。

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (40376026, 30671646)。

(BHA)、抗坏血酸 均为 Sigma公司产品;实验用水为二次去离子水。

SHZ- B 循环水真空泵、SENCO 旋转蒸发仪、DK- 526电热恒温水浴锅 上海;UV- 2100紫外可见分光光度计 尤尼柯;FD- 1冷冻干燥机 北京。

1.2 实验方法

1.2.1 橄榄多酚的提取与橄榄单宁的纯化 橄榄多酚的提取方法参照何志勇等<sup>[4]</sup>,分别取橄榄果实30g,然后分别加入 600mL 70%丙酮溶液、60%乙醇溶液和 60%甲醇溶液后用组织捣碎机捣碎,浸提30min,重复提取三次。收集提取液在 30 旋转减压蒸发除去溶剂,将含有多酚的水相冷冻干燥后得到橄榄多酚提取物,称重。取部分多酚提取物用少量 50%甲醇溶液溶解后上 Sephadex LH- 20色谱柱,用 50%甲醇溶液作洗脱液去杂,用 70%丙酮溶液洗脱并收集,得到纯化的橄榄单宁组分。30 旋转减压蒸发除去丙酮,水相冷冻干燥,样品置于 - 20 下保存备用。

1.2.2 样品溶液的制备 取 0.1g新鲜橄榄果实样品,与 2mL左右 70%丙酮溶液混合后研磨成浆。转移到25mL容量瓶中,蒸馏水定容,室温下避光保存备用。

1.2.3 多酚含量的测定<sup>[5]</sup> 取 0.3mL样品溶液,加入2.7mL蒸馏水后充分混匀。加入 1mL铁氰化钾溶液,并立即加入 1mL含 1mol/L 盐酸的三氯化铁溶液,混合完全后,置于 25 条件下反应 15min。然后加入3mL 6.02mol/L的磷酸溶液,充分混合后放置 2min,加入 2mL 1%阿拉伯胶,充分混合,3~5min后在 700nm下用分光光度计测定吸光值,蒸馏水作参比。

标准曲线的绘制:将纯化得到橄榄单宁样品配成浓度梯度为 0、40、80、120、160、200μg/mL的水溶液,各浓度取 0.3mL,加入 2.7mL蒸馏水后充分混匀。按以上步骤依次加入铁氰化钾溶液、三氯化铁溶液等试剂,最后测定吸光值并绘制成相应的标准曲线。

1.2.4 橄榄多酚光谱性质的测定 称取 0.01g橄榄多酚提取物,用 70%乙醇配制成 0.10g/L 橄榄多酚溶液,以溶剂为参比,在紫外可见分光光度计上,进行 300~700nm范围内的扫描,得到橄榄多酚的吸收光谱图。

1.2.5 DPPH·法测定自由基清除能力<sup>[6]</sup> 配制浓度为 0.004% DPPH·甲醇溶液(质量分数),避光保存。加不同浓度的样品溶液 0.1mL和 3mL的 0.004% DPPH·甲醇溶液于 10mL试管中,设 3个重复。摇匀后室温放置 30min,以甲醇溶剂做空白对照,测定其在 517nm处的吸光度值  $A_{sample}$ 。另测 3mL DPPH·溶液与 0.1mL甲醇溶剂混合后在 517nm处的吸光度值  $A_{control}$ 。橄榄多酚对 DPPH·自由基的清除率用抑制率  $K(\%)$ 来表示。

$$K(\%) = [(A_{control} - A_{sample}) / A_{control}] \times 100\%$$

式中,  $A_{sample}$  —3mL DPPH·溶液 + 0.1mL多酚溶液的吸光度;  $A_{control}$  —3mL DPPH·溶液 + 0.1mL甲醇溶剂的吸光度。

1.2.6 FRAP法测定抗氧化能力 参照 Benzie 与 Strain的方法<sup>[7]</sup>。该方法原理为  $Fe^{3+}$ -三吡啶三吡嗪(tripyridyl- triazine, TPTZ)可被样品中的还原物质还原为二价铁形式,呈现出明显的蓝色,并于 593nm处

具有最大光吸收,根据吸光度的大小计算样品抗氧化活性的强弱。步骤如下:取 0.1mL样品溶液(必要时稀释),加入 3mL TPTZ工作液(由 0.3mol/L 醋酸盐缓冲液 25mL, 10mmol/L TPTZ 溶液 2.5mL, 20mmol/L  $FeCl_3$  溶液 2.5mL组成),混匀后 25 反应 5min, 593nm测定吸光度。

标准曲线的绘制:取 0.01mol/L的抗坏血酸溶液 1、2、3、4、5mL分别置于 1~5号 50mL容量瓶中,用 50%甲醇定容到刻度,即得到 0.2、0.4、0.6、0.8、1.0mmol/L的抗坏血酸标准液,参比样为去离子水。各标准液分别与 TPTZ工作液反应,593nm处测得吸光度值,绘制标准曲线。

2 结果与讨论

2.1 不同溶剂的提取效果

甲醇、乙醇、丙酮、水均为植物多酚的常用提取溶剂,当样品为固体时,纯的有机溶剂不足以破坏样品中多酚类物质与蛋白质或其它物质的连接,多酚的提取率低,但当提取剂中水的比例过高时,糖类等水溶性杂质的浸出率也较高。不同溶剂系统对多酚物质的提取效果有显著的影响,如表 1所示,70%丙酮溶液的提取效果要明显好于 60%乙醇和 60%甲醇溶液。因此选择 70%丙酮溶液作为橄榄多酚的最适提取溶剂,可以充分提取橄榄中的多酚类物质。

表 1 不同溶剂系统对橄榄多酚提取物提取得率的影响

提取溶剂	70%丙酮	60%乙醇	60%甲醇
得率(%)	12.3	8.1	9.7

2.2 橄榄中多酚含量

橄榄中多酚含量较高,达  $572.30 \pm 39.71\text{mg/g}$ 干重;可见橄榄果实中具有较高的多酚含量,植物多酚的多羟基结构赋予其一系列独特的化学性质;植物多酚与蛋白质的结合是其最重要的特征,多酚与口腔唾液蛋白的结合,使人感觉到涩味,因此多酚与蛋白质结合的这个性质又称之为收敛性或涩性,收敛性是多酚多种生理活性的基础。

2.3 橄榄多酚的光谱分析

橄榄多酚的吸收光谱图见图 1。橄榄多酚的吸收光谱图中,可见光区无明显吸收,在紫外光区有两个较为明显的吸收,其波长范围分别为 280~300nm和 340~370nm,这是多酚类物质典型的吸收特征。

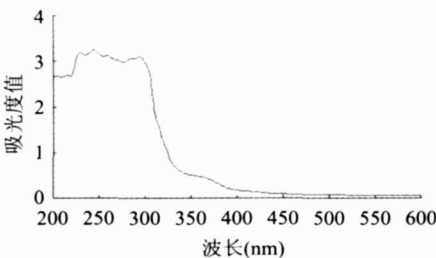


图 1 橄榄多酚的吸收光谱图

2.4 橄榄多酚提取物的自由基清除作用

二苯基苦基苯肼自由基 (1, 1- diphenyl- 2- picrylhydrazyl, DPPH·)分光测定法,在国内外广泛用于清除自由基物质性质的研究与天然抗氧化剂的筛选。DPPH·是一种性质较为稳定的自由基,其甲醇

溶液显紫色,在 517nm 处有最大吸收,当有自由基清除剂存在时,DPPH·的单电子由于被配对,DPPH·浓度减小而使其颜色变浅,在 517nm 处的吸光度值变小,这种颜色变浅的程度与配对电子数成化学计量关系,因此可用比色法进行定量分析。清除剂直接作用于 DPPH·自由基,反应时间短,用一般的分光光度计即可测定,故该方法操作简单、直接、灵敏、快速。按前述自由基清除率测试方法,对橄榄多酚提取物(GN)的自由基清除率进行测定,并以常用的抗氧化剂丁基羟基茴香醚(BHA)和抗坏血酸(AA)作为对照,结果见图 2。

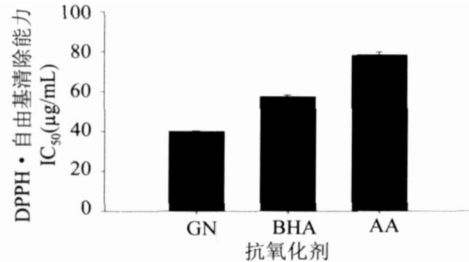


图 2 橄榄果实多酚提取物的 DPPH·自由基清除能力实验结果用达到 50% DPPH·自由基抑制率所需的抗氧化剂浓度来表示。实验结果表示为三组数据的平均值 ±标准差。

较低的 IC<sub>50</sub>值表示更高的自由基清除能力,从图 2 中可以看出,橄榄多酚提取物的自由基清除能力(IC<sub>50</sub>: 40.14μg/mL)高于人工合成抗氧化剂 BHA(IC<sub>50</sub>: 57.46μg/mL)和抗坏血酸(IC<sub>50</sub>: 78.25μg/mL)。表明橄榄多酚提取物具有较高的自由基清除能力。实验同时发现,随着多酚样品浓度的增加,自由基清除能力也逐渐增强。植物多酚的抗氧化性是一种综合效应,其抗氧化性是通过几种途径综合体现出来的:植物多酚以大量的酚羟基作为氢供体,对多种活性氧具有清除作用,可将单线态氧<sup>1</sup>O<sub>2</sub>还原成活性较低的三线态氧<sup>3</sup>O<sub>2</sub>,减少氧自由基产生的可能性,同时也是各种自由基有效的清除剂,生成活性较低的多酚自由基,打断自由基氧化的链式反应;其次,植物多酚可以邻位二酚羟基与金属离子螯合,减少金属离子对氧化反应的催化;再者,对于有氧化酶存在的体系,如体内主要的氧自由基生成的源头 XOD,多酚对其有显著的抑制能力;植物多酚还能与 V<sub>C</sub>和 V<sub>E</sub>等抗氧化剂之间产生协同效应,具有增效剂的作用<sup>[8]</sup>。因此可以推论:植物单宁的抗氧化性来源于多酚分子中大量的酚羟基,来源于多酚独特的分子结构<sup>[9]</sup>。进一步设想,多酚分子中的酚羟基含量越大,其抗氧化性可能越强。

表 2 橄榄多酚提取物的 FRAP 值

样品	FRAP (mmol/L AAE/g) <sup>a</sup>	
	平均值	标准差
橄榄多酚提取物	4.271	0.032
BHA	7.425	0.137

<sup>a</sup>FRAP 值以达到相同抗氧化能力的抗坏血酸的量来表示 (mmol/L AAE/g)。数据为平均值 ±SD (n=3)。

2.5 橄榄多酚提取物的 FRAP 抗氧化能力测定

由表 2 可以看出,橄榄多酚提取物的 FRAP 值虽然低于人工合成的常用抗氧化剂 BHA 的 FRAP 值,但仍然表现出较高的抗氧化能力。实验发现,橄榄果实中总酚含量较高,其 DPPH·自由基清除率和 FRAP 值也较高,说明橄榄果实中多酚类物质的含量与其抗氧化性密切相关。

由 Benzie 和 Strain 建立的 FRAP 法原理明确,操作简便,不需特殊仪器,易于标准化,已用于测定不同抗氧化物质、食物与生物样品的抗氧化活性,但是它所测结果反映的不是样品针对某一种自由基的清除活性,而是样品总的还原能力,一些学者因此认为该法测定结果可用来反映样品的总抗氧化活性<sup>[6]</sup>。

3 结论

提取橄榄多酚的最优条件:提取剂为 70% 丙酮溶液,物料 提取剂 = 1 (g) 20 (mL),常温浸提 1h,提取得率 12.3%。根据对橄榄果实中多酚含量进行测定,发现橄榄果实中多酚含量极高。同时实验采用了两种体外抗氧化实验模型,研究了橄榄多酚提取物的 DPPH·自由基清除能力及总抗氧化能力。结果表明,橄榄多酚提取物具有较强的自由基清除能力及较高的抗氧化活性;而且在各体系中,橄榄多酚提取物的抗氧化活性与其浓度之间均有良好的量效关系。因此,橄榄多酚提取物具有良好的抗氧化活性,可进一步研究开发为抗氧化功能性食品。

参考文献:

[1] 宋立江,狄莹,石碧. 植物多酚研究与利用的意义及发展趋势 [J]. 化学进展, 2000, 12 (2): 161~170.

[2] 苑景春. 橄榄辨析 [J]. 北京中医杂志, 2002, 21 (1): 42~43.

[3] 中华人民共和国药典委员会. 中华人民共和国药典 (一部) [M]. 北京:人民卫生出版社, 1995. 168.

[4] 何志勇,夏文水. 橄榄多酚的提取研究 [J]. 林产化学与工业, 2007, 27 (1): 77~80.

[5] Graham HD. Stabilization of the Prussian blue color in the determination of polyphenols [J]. J Agric Food Chem, 1992, 40: 801~805.

[6] Braca A, Tommasi N D, Bari L D, et al. Antioxidant principles from *Bauhinia terapotensis* [J]. J Nat Prod, 2001, 64: 892~895.

[7] Benzie IFF, Strain JJ. The ferric reducing ability of plasma as a measure of "antioxidant power": the FRAP assay [J]. J Anal Biochem, 1996, 239: 70~76.

[8] 石碧,狄莹. 植物多酚 [M]. 北京:科学出版社, 2000. 131~132.

[9] Yoshida T, Mori K, Hatano T, et al. Effect of tannins and related polyphenols on superoxide anion radical, and 1, 1-diphenyl- 2-picrylhydrazyl radical [J]. Chem Phar Bull, 1989, 37: 2016~2025.